

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.  
Vol. 18, 1980, pp. 775–780

## Ein Qualitätskontrollsystem für Biotransformationsenzyme in der Dünndarmmucosa

Von E. Heimsch und T. Dobler<sup>1)</sup>

Abteilung für Klinische Chemie der Universität Ulm

(Eingegangen am 23. August 1979/10. April/1. Juli 1980)

**Zusammenfassung:** Es wurde ein System für die Qualitätskontrolle von Aktivitätsbestimmungen der Arylkohlenwasserstoffhydroxylase (Benzpyrenhydroxylase), der Ethoxycumarin-O-Deethylase, der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase, der Epoxidhydrase und der Uridindiphosphoglucuronyltransferase entwickelt. Dabei wurden lyophilisierte und tiefgefrorene Proben aus dem postmitochondrialen Überstand der Dünndarmmucosa von Ratten und Meerschweinchen verwendet, der durch eine 1:5 Verdünnung von Mucosa durch K-Phosphatpuffer gewonnen wurde. Für die NADPH-Cytochrom-c-Reduktase wurde die Mikrosomenfraktion aus Dünndarmmucosa von Ratten eingesetzt. Die Proben lagerten bei  $-30^{\circ}\text{C}$ ; die Variationskoeffizienten in der Serie (15 Proben) lagen bei 5%, von Tag zu Tag (15 Tage) bei 10%. Die Proben erwiesen sich bei  $-30^{\circ}\text{C}$  bis 6 Monate als stabil.

### *A system for quality control of biotransformation enzymes in the mucosa of small intestine*

**Summary:** A system for quality control of the determination of arylhydrocarbonhydroxylase (benzpyrenhydroxylase), ethoxycoumarin-O-deethylase, NADPH-cytochrome-c-reductase, epoxidehydrase and uridindiphosphoglucouronyltransferase was developed. We used lyophilized and frozen samples of postmitochondrial supernatant of rat and guinea pig small intestinal mucosa, which was prepared using a 1:5 ratio of mucosa to K-phosphate buffer. For NADPH-cytochrome-c-reductase, the microsomal suspension from rat small intestine was used. The samples were stored at  $-30^{\circ}\text{C}$ . The coefficient of variation within run was about 5% (15 samples), the coefficient of variation between run (15 days) about 10%. The control specimens were stable for 6 months.

### Einführung

Die systematische, statistische Qualitätskontrolle gehört bei Substrat- und Enzymaktivitätsbestimmungen im Gewebe bei *Forschungsfragestellungen* bisher noch zur Seltenheit.

In dieser Arbeit wird für ausgewählte Biotransformationsenzyme ein Qualitätskontrollsystem vorgestellt und das Funktionieren dieses Systems aufgezeigt.

Die Arylkohlenwasserstoffhydroxylase (1) (Benzpyrenhydroxylase) (EC 1.14.14.2) katalysiert die Hydroxylierung von Benzpyren zu 3-Hydroxybenzpyren und zeigt die Oxidationsfähigkeit des Cytochrom-P-450-Multienzymsystems auf. Die Ethoxycumarin-O-deethylase (2)

spaltet Ethoxycumarin zu 7-Hydroxycumarin und zeigt die Deethylierungsaktivität dieses Systems und die NADPH-Cytochrom-c-Reduktase (3) (EC 1.6.2.4) ist ein „Marker“ für den Elektronentransfer. Die Epoxidhydrase (4) (EC 4.2.1.63) katalysiert die Wasseranlagerung an Epoxide, die als Intermediärprodukte teilweise bei dem Oxidationsvorgang entstehen und dabei das entsprechende Diol bilden. Einen zweiten Schritt der Biotransformation katalysiert die Uridindiphosphoglucuronyltransferase (5) (EC 2.4.1.17), indem sie die sich an die Hydroxylierung oft anschließende Glucuronidierung katalysiert.

### Material und Methoden

Bei der Herstellung der Qualitätskontrollproben für die Benzpyrenhydroxylase, Ethoxycumarin-O-deethylase und die Epoxidhydrase wurde vom postmitochondrialen Überstand aus Dünndarmmucosa von Meerschweinchen (Birbright-white, Süddeutsche Versuchstierfarm, Tuttlingen), für die Uridindiphosphoglucuronyltransferase von Ratten (CH-BB, Thomae, Biberach) ausgegangen. Für die Herstellung der Qualitätskontrollproben

<sup>1)</sup> Teile der Arbeit sind in der Dissertation von T. Dobler enthalten. Auszugsweise wurden Ergebnisse auf der gemeinsamen Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Klinische Chemie und der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie in Salzburg (29.–31. 3. 1979) und auf dem „3rd European Congress of Clinical Chemistry“, Brighton (3.–8. 6. 1979) vorgestellt.

Tab. 1. Methode zur Bestimmung von Benzpyrenhydroxylase in Dünndarmmucosa von Meerschweinchen.

Pro Analysenserie wird ein Leerwert bestimmt und von den Emissionswerten subtrahiert. Die Bestimmungen werden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

## Lösung 1 (NADPH Regenerierungslösung)

14,9 mg NADP  
51,6 mg *D L*-Isocitronensäure Na<sub>3</sub>-Salz (Fa. Serva, Heidelberg)  
6 ml 0,5 mol/l Tris/HCl + 0,15 mol/l KCl, pH 7,4  
6 ml bidest. Wasser  
2 ml 0,1 mmol/l MnCl<sub>2</sub>  
2 ml 0,1 mol/l MgCl<sub>2</sub>  
25 µl Isocitrat-Dehydrogenase  
(2 U/mg = 20 KU/l, 25 °C, Fa. Boehringer-Mannheim)

In Reagenzgläser pipettieren:	Probe	Leerwert
Lösung 1	200 µl	200 µl
Lösung 2 Benzpyren in abs. Ethanol (1,7 mg/4 ml)	25 µl	25 µl
Lösung 3 bidest. Wasser	175 µl	175 µl
Lösung 4 Aceton (0 °C)	—	1 ml

## 1. Starten der Reaktion im Schüttelwasserbad

Postmitochondrialer Überstand oder Mikrosomensuspension 100 µl 100 µl  
Inkubationszeit: 20 min.  
Inkubationstemp.: 37 °C

## 2. Beenden der Reaktion

Lösung 4 Aceton (0 °C) 1 ml —  
Lösung 5 *n*-Hexan 3,25 ml 3,25 ml

Weitere 5 min inkubieren, mit Mischer 10 s schütteln — stehen lassen, bis Phasen getrennt sind.

## 3. Trennungsschritt

Von der oberen Hexanphase 1 ml in Zentrifugenröhrchen pipettieren.

## 4. Meßvorbereitung

3 ml 0,1 mol/l NaOH (Lösung 6) zugeben, mit Mischer gut schütteln, kurz zentrifugieren, obere Hexanphase absaugen und innerhalb von 3 min mit dem Fluorometer messen.

## 5. Messung

Emissionswellenlänge: 522 nm  
Anregungswellenlänge: 396 nm

Das Fluorometer wird vor jeder Messung mit Chininsulfat (0,34 µmol/l 0,1 mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) kalibriert.

Chininsulfat:

Emissionswellenlänge: 450 nm  
Anregungswellenlänge: 350 nm

## 6. Auswertung

erfolgt über eine Standardkurve mit in Aceton gelöstem 3-Hydroxybenzpyren.

der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase mußte eine Mikrosomenpräparation durchgeführt werden. Die Aktivitätsbestimmung der Benzpyrenhydroxylase (Tab. 1) wurde in Anlehnung an Wattenberg (1), die der Ethoxycumarin-O-deethylase (Tab. 2) in Anlehnung an Aitio (2), die der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase (Tab. 3) nach Williams (3) mit einem molaren Absorptionskoeffizienten von  $27,7 \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^2$  (6) für das reduzierte Cytochrom c, die der Epoxidhydratase (Tab. 4) in Anlehnung an Oesch (4) und die Aktivitätsbestimmungen der Uridindiphosphoglucuronyltransferase (Tab. 5) nach Aitio (5) durchgeführt.

Tab. 2. Methode zur Bestimmung von Ethoxycumarin-O-Deethylase in Dünndarmmucosa von Meerschweinchen.

Pro Analysenserie wird ein Leerwert bestimmt und von den Emissionswerten subtrahiert. Die Bestimmungen werden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

## Lösung 1 (NADPH Regenerierungslösung)

14,9 mg NADP  
51,6 mg *D L*-Isocitronensäure Na<sub>3</sub>-Salz (Fa. Serva, Heidelberg)  
6 ml 0,5 mol/l Tris/HCl + 0,15 mol/l KCl, pH 7,4  
6 ml bidest. Wasser  
2 ml 0,1 mmol/l MnCl<sub>2</sub>  
2 ml 0,1 mol/l MgCl<sub>2</sub>  
25 µl Isocitrat-Dehydrogenase  
(2 U/mg = 20 KU/l, 25 °C, Fa. Boehringer-Mannheim)

In Plastikröhrchen pipettieren:	Probe	Leerwert
Lösung 1	200 µl	200 µl
Lösung 2 0,1 mol/l Tris/HCl pH 7,6 + 0,2 mmol/l 7-Ethoxycumarin	250 µl	250 µl
Lösung 3 0,31 mol/l Trichloressigsäure	—	500 µl

## 1. Starten der Reaktion im Wasserbad:

Postmitochondrialer Überstand oder Mikrosomensuspension 50 µl 50 µl  
Inkubationszeit: 20 min  
Inkubationstemp.: 37 °C

## 2. Beenden der Reaktion:

Lösung 3: 0,31 mol/l Trichloressigsäure mit Mischer gut mischen 500 µl  
Lösung 4: 1,6 mol/l Glycin-NaOH Puffer pH 10,5 4 ml 4 ml

kurz mischen und 10 min bei 2000 min<sup>-1</sup> zentrifugieren (Raumtemperatur)

## 3. Messung

Der Überstand wird mit dem Fluorometer gemessen  
Emissionswellenlänge: 390 nm  
Anregungswellenlänge: 440 nm

Das Fluorometer wird vor jeder Messung mit Chininsulfat (0,34 µmol/l 0,1 mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) kalibriert.

Chininsulfat:

Emissionswellenlänge: 450 nm  
Anregungswellenlänge: 350 nm

## 4. Auswertung

erfolgt über eine Standardkurve mit gelöstem 7-Hydroxycumarin (0,5 ml 0,1 mmol/l 7-Hydroxycumarin in 0,1 mol/l Tris/HCl Puffer pH 8,0 + 4,5 ml 1,6 mol/l Glycin-NaOH Puffer pH 10,5)

Die Homogenisation der Mucosaproben und die Rehomogenisation der Mikrosomen erfolgte mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator (Braun Melsungen AG, Melsungen).

Als Zentrifugen wurden zur Gewinnung des postmitochondrialen Überstandes die Beckman Kühlzentrifuge J-21, zur Mikrosomenpräparation die Beckman Ultrazentrifuge L5-75, verwendet (Beckman Instruments GmbH, München). Zum Lyophilisieren der Kontrollproben wurde die Gefriertrocknungsanlage L 05 (WKF-Gesellschaft für elektrophysikalischen Apparatebau, Brandau, Odenwald) verwendet. Nach Spülung mit 0,15 mol/l KCl-Lösung wurden 50 cm des Dünndarms bei Meerschweinchen und 20 cm bei Ratten vom Pylorus ausgehend mit einer Knöpfschere aufgeschnitten und auf einer kalten Glasplatte ausgebreitet. Die Mucosa wurde bis zur Muscularis mucosae mittels eines Objektträgers abgeschabt.

Nach Bestimmung des Feuchtgewichts der abgeschabten Mucosa wurde diese mit der vierfachen Menge an 0,1 mol/l Kalium-

Tab. 3. Methode zur Bestimmung von NADPH-Cytochrom-c-Reduktase aus der Dünndarmmucosa von Ratten und Meerschweinchen.

Lösung 1: 10 ml 0,05 mol/l K-Phosphatpuffer pH 7,7 + 0,65 mg KCN	
Lösung 2: Cytochrom-c-Lösung: 4,5 mg Cytochrom c + 1 ml Lösung 1	
Lösung 3: NADPH-Lösung: 1,66 mg NADPH + 8 ml Lösung 1	
1. Inkubation (in Quarzküvetten 1 cm Schichtdicke)	
	Probe
Lösung 1	500 µl
Lösung 2	100 µl
Probe (Mikrosomensuspension)	100 µl
gut mischen und Küvette in vortemperiertes Fotometer stellen: Temp.: 25 °C, λ = 550 nm	
2. Starten der Reaktion mit:	
Lösung 3	400 µl
Meßzeit: 10 min, wenn ΔA nicht linear, Probe verdünnen und Ergebnisse mit Verdünnungsfaktor multiplizieren.	
3. Auswertung	
$\frac{\Delta A \times 397}{c_{\text{Protein}} (\text{mg/ml}) \times \text{min} \times \text{ml}} = \frac{\text{nmol Cyt. c red}}{\text{min} \times \text{mg Protein}}$	

Phosphatpuffer pH 7,4 versetzt. Anschließend erfolgte die Homogenisation. Bei einer Umdrehungszahl von 400 min<sup>-1</sup> wurde vier Mal 15 Sekunden lang homogenisiert und bei 800 min<sup>-1</sup> nochmals vier Mal 15 Sekunden lang. Nach jeweils 15 Sekunden wurde eine Pause von einer Minute eingelegt, um eine Überwärmung der Probe zu verhindern. Die Proben wurden anschließend in der vorgekühlten Kühlzentrifuge 10 Minuten bei 20000 g und einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert. Vom so erhaltenen Überstand wurden je 500 µl in 1 ml Reaktionsgefäße mit Deckel abgefüllt und ein Teil bei -30 °C tiefgefroren, während der andere Teil bei -30 °C und 0,08 Torr 48 Stunden lyophilisiert wurde.

Bei der Mikrosomenpräparation wurde der postmitochondriale Überstand 60 Minuten bei 105 000 g und einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgossen und das Sediment mit dem gleichen Volumen an 0,1 mol/l Kalium-Phosphatpuffer pH 7,4 rehomogenisiert (5 × 15 Sekunden mit jeweils einer Minute Pause). Der gesamte Vorgang wurde anschließend wiederholt. Die nach dem erneuten Homogenisieren erhaltene Fraktion ist die zur Qualitätskontrolle verwendete Mikrosomensuspension, die, wie beim postmitochondrialen Überstand beschrieben portioniert, tiefgekühlt bzw. lyophilisiert wurde.

### Ergebnisse

#### Präzision

Die Variationskoeffizienten in Serie und von Tag zu Tag wurden für jedes der Enzyme bestimmt.

#### Benzpyrenhydroxylase (Tab. 6 und 7)

Bei den lyophilisierten Proben konnte ein Variationskoeffizient bei 15 Proben in Serie von 9% und von Tag zu Tag (15 Tage) von 8,5% erreicht werden. Ein leichter Anstieg der Aktivität innerhalb der 15 Tage war zu beobachten (a = +0,129). Bei den tiefgefrorenen Proben konnte in Serie ein Variationskoeffizient bei gleicher Serienlänge von 3,8% und von Tag zu Tag bei wieder 15 Tagen von 12% erzielt werden. Auch hier war inner-

Tab. 4. Methode zur Bestimmung von Epoxidhydrase in Dünndarmmucosa von Meerschweinchen.

Pro Analysenserie wird ein Leerwert bestimmt und von der Zählrate (2 min) subtrahiert. Die Bestimmungen werden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

Stammlösung: (Lösung 1)

- 50 µl Originallösung 370 GBq/mol  $\hat{=}$  10 Ci/mol  
43,4 MBq/ml = 1,17 Ci/l,  
[7-H<sup>3</sup>]Styrolepoxid, NEN

- 15 ml nicht radioaktives Styrolexpoxid in Acetonitril  
(67,2 mg Styrolepoxid auf 100 ml Acetonitril)

1. Inkubation (in 20 ml Gläser mit Stopfen)

Lösung 2	Probe	Leerwert
0,5 mol/l Tris/HCl pH 9,0 mit 1 ml/l Tween 80 + bidest. Wasser 1:4 verd.	220 µl	270 µl
Postmitochondrialer Überstand oder Mikrosomensuspension	50 µl	—
2. Starten der Reaktion mit:		
Lösung 1	30 µl	30 µl
Inkubationszeit: 10 min Inkubationstemp.: 37 °C		

3. Beenden der Reaktion

Lösung 3 Petroleumbenzin (0 °C)	5 ml	5 ml
---------------------------------	------	------

4. Trennungsschritt

Röhrchen etwa 30 min in Tiefkühltruhe stellen (-20 °C); ist die Wasserphase gefroren, wird das Petroleumbenzin schnell weggeschüttet. Durch nochmalige Zugabe von 5 ml Petroleumbenzin wird der Vorgang wiederholt.

5. Vorbereitung der Messung

Zu der extrahierten Wasserphase werden 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Instagel) gegeben und das Gemisch in ein Szintillationsgefäß umgefüllt. Das Röhrchen wird mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit gespült und diese ebenfalls in das Meßgefäß gegeben.

6. Standard: 30 µl Lösung 1 + 10 ml Instagel.

7. Messen: Mit Tritium-Kanal im Szintillationszähler.

8. Auswerten: 
$$\frac{\text{BqProbe}}{\text{BqStandard}} \times 179,5 \text{ nmol} \times 100$$
  
15 min × 0,15 ml × x% postmitochondrialer Überstand

x% postmitochondrialer Überstand =  $\frac{\text{Verdünnung} \times}{100}$

(z. B. 20% postmitochondrialer Überstand = 1:5 Verdünnung der Mucosa)

halb von 15 Tagen ein leichter Anstieg von a = 0,166 zu beobachten.

#### Ethoxycumarin-O-deethylase (Tab. 6 und 7)

Bei den lyophilisierten Proben war der Variationskoeffizient in Serie bei 15 Proben 8,4% und von Tag zu Tag (15 Tage) ebenfalls 8,4%. Die Aktivität der Proben veränderte sich in den 15 Tagen nicht. Mit den bei -30 °C tiefgefrorenen Proben wurde in Serie ein VK von 8,5% und von Tag zu Tag von 13,1% erreicht. Auch hier änderte sich die Aktivität während der 15 Tage nicht.

Tab. 5. Methode zur Bestimmung von Uridindiphosphoglucuronyltransferase in Dünndarmmucosa von Ratten.

Pro Bestimmung muß jeweils ein Leerwert bestimmt werden. Die Absorption des Leerwerts ist größer als die der Probe.

Lösung 1: 0,5 mol/l K-Phosphatpuffer pH 7,0  
+ 0,35 mmol/l *p*-Nitrophenol  
+ 10 mmol/l Na<sub>2</sub>EDTA

In Reaktionsgefäß pipettieren:	Probe	Leerwert
Lösung 1	100 µl	100 µl
Lösung 2 Lösung 1 + UDPGlcUA (4 mg/ml) muß täglich frisch angesetzt werden!	100 µl	100 µl

1. Vorinkubation: 2 min bei 37 °C im Wasserbad

2. Starten der Reaktion:

Postmitochondrialer Überstand  
oder Mikrosomensuspension 50 µl 50 µl

Inkubationszeit: 15 min  
Inkubationstemp.: 37 °C

3. Beenden der Reaktion:

Lösung 3: 30 g/l Trichloressigsäure 900 µl 900 µl  
Das ausgefällte Protein wird 2 min bei etwa 2000 min<sup>-1</sup> abzentrifugiert (Raumtemperatur).

4. Meßvorbereitung + Messung

Der Überstand wird in Reaktionsgefäße abgeschüttet, welche 100 µl 5 mol/l NaOH (Lösung 4) enthalten.  
Mit Mischer gut mischen und im Spektralphotometer messen (gegen Wasser bei 400 nm).

5. Auswertung über Standardkurve mit *p*-Nitrophenol.

#### *NADPH-Cytochrom-c-Reduktase* (Tab. 6 und 7)

Bei den lyophilisierten Proben konnte ein Variationskoeffizient in der Serie (15 Proben) von 3,1% und von Tag zu Tag (15 Tage) von 4,7% erreicht werden. Die Aktivität der Proben änderte sich während der 15 Tage nicht.

Bei den tiefgefrorenen Proben ergab sich in der Serie ein Variationskoeffizient von 2,1% und von Tag zu Tag von 5,7%. Auch hier blieben die Proben während der 15 Tage stabil.

#### *Epoxidhydrase* (Tab. 6 und 7)

Die lyophilisierten Proben ergaben in der Serie (15 Proben) einen Variationskoeffizienten von 1,8% und von Tag zu Tag (15 Tage) von 4,6%. Eine Änderung der Aktivität war auch hier während 15 Tagen nicht zu beobachten. Die bei -30 °C tiefgefrorenen Proben ergaben in Serie einen Variationskoeffizienten von 3,2% und von Tag zu Tag von 10%, eine Abnahme der Aktivität während 15 Tagen mit  $a = -1,01$  war zu beobachten.

#### *Uridindiphosphoglucuronyltransferase* (Tab. 6 und 7)

Bei der Uridindiphosphoglucuronyltransferase konnte mit den lyophilisierten Proben in Serie (15 Proben) ein Variationskoeffizient von 2,5% und von Tag zu Tag (15 Tage) von 4,3% erreicht werden. Bei den bei -30 °C tiefgefrorenen Proben wurde in Serie ein Variationskoeffizient von 4,8% und von Tag zu Tag von 4,1% festgestellt. Die Aktivität änderte sich während der 15 Tage weder bei den lyophilisierten noch bei den tiefgefrorenen Proben.

Tab. 6. Variationskoeffizienten (VK%) in der Serie. FG = Feuchtgewicht mProt. = mikrosomales Protein.

Enzym	Anzahl der Proben	Behandlungsart	Mittelwert	Einheit	Standardabweichung	Variationskoeffizient VK (%)
Benzpyrenhydroxylase	15	lyophilisiert	0,255	$\frac{\text{nmol}}{\text{min} \times \text{g FG}}$	0,023	9,0
Benzpyrenhydroxylase	15	-30 °C gefroren	0,399	$\frac{\text{nmol}}{\text{min} \times \text{g FG}}$	0,015	3,8
Ethoxycumarin-O-Deethylase	15	lyophilisiert	3,5	$\frac{\text{nmol}}{\text{min} \times \text{g FG}}$	0,29	8,4
Ethoxycumarin-O-Deethylase	15	-30 °C	8,5	$\frac{\text{nmol}}{\text{min} \times \text{g FG}}$	0,31	8,5
NADPH-Cytochrom-c-Reduktase	15	lyophilisiert	81,4	$\frac{\text{nmol}}{\text{min} \times \text{mg mProt.}}$	2,52	3,10
NADPH-Cytochrom-c-Reduktase	15	-30 °C gefroren	58,1	$\frac{\text{nmol}}{\text{min} \times \text{mg mProt.}}$	1,24	2,13
Epoxidhydrase	15	lyophilisiert	128,4	$\frac{\text{nmol}}{\text{min} \times \text{g FG}}$	2,35	1,8
Epoxidhydrase	15	-30 °C gefroren	98,2	$\frac{\text{nmol}}{\text{min} \times \text{g FG}}$	3,19	3,2
Uridindiphosphoglucuronyltransferase	15	lyophilisiert	38,1	$\frac{\text{nmol}}{\text{min} \times \text{g FG}}$	0,97	2,5
Uridindiphosphoglucuronyltransferase	15	-30 °C	35,8	$\frac{\text{nmol}}{\text{min} \times \text{g FG}}$	1,73	4,8

Tab. 7. Variationskoeffizienten (VK %) von Tag zu Tag.

Enzym	Anzahl der Proben	Behandlungsart	Mittelwert	Einheit	Standardabweichung	Variationskoeffizient (VK %)	Regressionsgleichung $y = ax + b$ $a = \text{Steigung}$ $b = \text{Ordinatenabschnitt}$	F-Wert Regressionskoeffizient = 0	Schranke	Hypothese Regressionskoeffizient = 0 angenommen
Benzpyrenhydroxylase	15	lyophilisiert	0,350	$\frac{\text{nmol}}{\text{min} \times \text{g FG}}$	0,03	8,5	$y = 0,13 + 0,31$	22,9	4,67	nein
	15	- 30 °C	0,374	$\frac{\text{nmol}}{\text{min} \times \text{g FG}}$	0,04	12,0	$y = 0,16 + 0,33$	10,1	4,67	nein
Ethoxycumarin-O-Deethylase	15	lyophilisiert	3,8	$\frac{\text{nmol}}{\text{min} \times \text{g FG}}$	0,32	8,4	$y = 3,80$	0,054	4,67	ja
	15	- 30 °C gefroren	10,3	$\frac{\text{nmol}}{\text{min} \times \text{g FG}}$	1,35	13,1	$y = 10,28$	0,138	4,67	ja
NADPH-Cytochrom-c-Reduktase	15	lyophilisiert	115	$\frac{\text{nmol}}{\text{min} \times \text{mg mProt.}}$	5,4	4,7	$y = 115$	0,018	4,67	ja
	15	- 30 °C	119	$\frac{\text{nmol}}{\text{min} \times \text{mg mProt.}}$	6,8	5,7	$y = 119$	0,173	4,67	ja
Epoxidhydrase	15	lyophilisiert	108,6	$\frac{\text{nmol}}{\text{min} \times \text{g FG}}$	5,02	4,6	$y = 108,6$	0,0009	4,67	ja
	15	- 30 °C	96,1	$\frac{\text{nmol}}{\text{min} \times \text{g FG}}$	9,66	10,0	$y = - 1,01 + 107,4$	10,28	4,67	nein
Uridindiphosphoglucuronyltransferase	15	lyophilisiert	29,2	$\frac{\text{nmol}}{\text{min} \times \text{g FG}}$	1,25	4,3	$y = 29,2$	0,153	4,67	ja
	15	- 30 °C	33,5	$\frac{\text{nmol}}{\text{min} \times \text{g FG}}$	1,38	4,1	$y = 33,5$	0,014	4,67	ja

### Haltbarkeit der Proben (Tab. 8 und 9)

Die Proben erwiesen sich bis zu einer getesteten Zeit von sechs Monaten als stabil unter der Voraussetzung, daß auch die lyophilisierten Proben bei - 30 °C gelagert werden. Werden die lyophilisierten Proben bei Raumtemperatur gelagert, so tritt schon nach einer Woche ein Aktivitätsverlust von meist über 50% ein.

### Diskussion

Bei der Messung der Aktivitäten der Benzpyrenhydroxylase und der Ethoxycumarin-O-deethylase sind die relativ hohen Variationskoeffizienten von Tag zu Tag durch die Verwendung von fluorimetrischen Methoden bedingt. Die Aktivitätsbestimmungen beruhen jeweils auf einer Zweipunktkinetik; die Messung ist schon durch die Instabilität des Chininsulfatstandards nicht so reproduzierbar, verglichen mit der Messung der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase, die auf einer absorptionsphotometrischen Methode beruht, bei der 10 Meßpunkte erhalten werden. Für den leichten Aktivitätsanstieg bei der Benzpyrenhydroxylase muß bei den tiefgefrorenen Proben ein Verdunstungseffekt diskutiert werden; auch die in den lyophilisierten Proben verbliebene Restfeuchte dürfte teilweise verdunstet sein. Bei der relativ hohen Aktivität

des Enzyms in den verwendeten Proben macht sich dieser Effekt hier bemerkbar. Obwohl bei der Messung der Epoxidhydraseaktivität ein Trennungsschritt enthalten ist (Trennung von Styroglykol und Styrolepoxid) konnten doch sehr kleine Variationskoeffizienten in der Serie und von Tag zu Tag erhalten werden. Da mit den lyophilisierten Proben auch von Tag zu Tag noch ein Variationskoeffizient von 4,6% erhalten werden konnte und die Aktivität sich während den 15 Tagen nicht änderte, scheinen sie für die Qualitätskontrolle der Epoxidhydrase vorteilhafter gegenüber tiefgefrorenen Proben zu sein. Die Messung der Uridindiphosphoglucuronyltransferase-Aktivität beruht auf einer absorptionsphotometrischen Methode und die Variationskoeffizienten von Tag zu Tag waren geringer als bei den Enzymaktivitätsmessungen, die auf fluoreszenzphotometrischen Methoden basieren.

Im Langzeittest unter Aufbewahren bei - 30 °C (Tab. 8) erwiesen sich die lyophilisierten und die tiefgefrorenen Proben bis zu 6 Monate als stabil, allerdings ist auch hier wie bei der Besprechung der Stabilität der Benzpyrenhydroxylase über 15 Tage bis zu 10 Wochen eine stetige Zunahme der gemessenen Aktivität zu sehen, was wiederum trotz Aufbewahrung in verschlossenen Eppendorf-Reaktionsgefäßen für einen Verdunstungseffekt

Tab. 8. Haltbarkeit der Proben bei einer Lagerung bei -30 °C. FG = Feuchtgewicht; mProt = mikrosomales Protein.

Enzym	Behandlungsart	Einheit	1. Tag	nach 7 Tagen	nach 14 Tagen	nach 6 Wochen	nach 10 Wochen	nach 24 Wochen
Benzpyrenhydroxylase	lyophilisiert	nmol min × g FG	0,309	0,334	0,396	0,396	0,433	0,322
	-30 °C	nmol min × g FG	0,371	0,384	0,408	0,445	0,483	0,346
Ethoxycumarin-O-deethylase	lyophilisiert	nmol min × g FG	3,89	3,44	4,04	4,27	4,42	3,75
	-30 °C	nmol min × g FG	9,97	9,29	10,75	11,84	10,49	8,99
NADPH-Cytochrom-c-Reduktase	lyophilisiert	nmol min × mg mProt.	116	114	112	117	98	102
	-30 °C	nmol min × mg mProt.	112	120	114	102	102	105
Epoxidhydrase	lyophilisiert	nmol min × g FG	110,0	117,9	107,9	97,8	115,5	99,6
	-30 °C	nmol min × g FG	95,9	105,4	82,2	86,2	92,3	83,5
Uridindiphosphoglucuronyltransferase	lyophilisiert	nmol min × g FG	28,3	30,3	29,7	29,4	28,4	33,3
	-30 °C	nmol min × g FG	33,3	36,3	35,4	34,5	33,9	39,9

Tab. 9. Haltbarkeit der lyophilisierten Proben bei Raumtemperatur. FG = Feuchtgewicht.

Enzym	Einheit	direkt nach Entnahme aus Tiefkühlschrank (-30 °C)	nach 7 Tagen	nach 14 Tagen
Benzpyrenhydroxylase	nmol min × g FG	1,57 = 100%	0,72 = 45,8%	0,61 = 38,8%
Ethoxycumarin-O-Deethylase	nmol min × g FG	5,3 = 100%	2,5 = 47,2%	0,67 = 12,6%
Epoxidhydrase	nmol min × g FG	120,46 = 100%	70,67 = 58,7%	30,9 = 25,6%
Uridindiphosphoglucuronyltransferase	nmol min × g FG	16,95 = 100%	15,17 = 89,5%	11,60 = 68,4%

## Literatur

1. Wattenberg, L., Leony, J. L. & Strand, P. J. (1962), *Cancer Research* 22, 1120-1124.
2. Aitio, A. (1978), *Anal. Biochem.* 85, 488-491.
3. Williams, C. H. & Kamin, H. (1962), *J. Biol. Chem.* 237, 587-595.
4. Oesch, F., Jerina, D. M. & Daly, J. (1971), *Biochim. Biophys. Acta* 227, 685-691.
5. Aitio, A. (1974), *Int. J. Biochem.* 5, 325-330.
6. Phillips, A. H. & Langdon, R. G. (1962), *J. Biol. Chem.* 237, 2652-2660.

Dr. E. Heimsch  
Zentrum für Klinische Chemie und Transfusions-Medizin  
Abteilung für Klinische Chemie der Universität Ulm  
Steinhövelstraße 9  
D-7900 Ulm